



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA- UNICEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
CURSO: BACHARELADO EM BIOMEDICINA

PAULA SILVA LOPES

***QUORUM SENSING, FORMAÇÃO DO BIOFILME E A LIGAÇÃO DIRETA COM A
RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS***

Trabalho de conclusão de curso de
Biomedicina apresentado em forma de
artigo sob orientação do professor Dr.
Paulo Roberto Queiroz.

BRASÍLIA

2018

***Quorum Sensing*, Formação Do Biofilme E A Ligação Direta Com A Resistência À Antimicrobianos**

Paula Silva Lopes¹
Paulo Roberto Queiroz²

RESUMO

As bactérias resistentes a antibióticos e que são capazes de formar biofilme são uma enorme preocupação para a saúde pública, pois provocam o aumento da taxa de mortalidade. O objetivo do trabalho foi descrever a relação do *Quorum sensing* com a formação do biofilme e a associação com a resistência bacteriana a antimicrobianos, através de uma revisão bibliográfica narrativa. A fim de formular uma estratégia de intervenção eficaz para combater essas infecções é importante discutir sobre o sistema de comunicação bacteriana, a formação do biofilme e os mecanismos de resistência. O *Quorum sensing* é o termo utilizado para descrever essa comunicação química entre as bactérias, esse mecanismo consiste na liberação de autoindutores no meio, o que permite que o ambiente seja monitorado e a partir de determinada concentração desencadeiam alterações na expressão genética das bactérias, proporcionando a realização de funções biológicas como a bioluminescência, indução de fatores de virulência, formação de biofilme.

Palavras-chave: resistência a antimicrobianos; formação do biofilme; comunicação bacteriana.

***Quorum Sensing*, Biofilm Formation, and the Direct Connection with Resistance to Antimicrobials**

ABSTRACT

The antibiotic resistant bacteria that are capable of forming biofilm are a huge preoccupation for public health, as they cause an increase in the mortality rate. The objective of this work was to describe the connection of *Quorum sensing* with biofilm formation and the association with bacterial resistance to antimicrobials, through a narrative bibliographic review. With the purpose of formulating/creating an intervention strategy effective to fight these infections it is important to discuss the bacterial communication system, the biofilm formation and the resistance mechanisms. The Quorum sensing is the term used to describe this chemical communication between the bacteria, this mechanism consists on releasing self-inductors in the system, which allows the environment to be monitored and from a determined concentration initiate alterations on the genetic expression of the bacteria, providing biological functions such as bioluminescence, virulence induction factors, biofilm formation.

Key-words: antimicrobial resistance; biofilm formation; bacterial communication.

¹ Acadêmica em Biomedicina do UniCeub.

² Professor Doutor em Biologia Animal. Professor do curso de Biomedicina - UniCEUB.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos unicelulares que, antigamente, eram consideradas independentes, auto-suficientes e incapazes de se comunicar. Com o passar do tempo e com o desenvolver da tecnologia, esta visão mudou e pode-se provar que esses organismos apresentam habilidade de se organizar em grupos, tornando-se capazes de se comunicar, o que está se mostrando ser um fator crucial para o desenvolvimento de diversas doenças (PARSEK; GREENBERG, 2005).

Várias bactérias desenvolveram a capacidade de se adaptar ao meio de cultura por meio da secreção de substâncias químicas com baixa massa molecular associados à fase de crescimento, conseguindo assim controlar a expressão de genes específicos, esse processo foi denominado como *Quorum Sensing* (DELISA *et al.*, 2001).

O *Quorum Sensing* é a expressão usada para descrever a comunicação química bacteriana. Os sinais químicos produzidos, secretados e detectados pelas bactérias podem estar relacionados à densidade celular (auto indutores) ou podem ser produzidos em diferentes estágios de crescimento (PARSEK; GREENBERG, 2005). Além disso, a sinalização permite que o ambiente em que as bactérias se encontram seja monitorado e que as expressões de seus genes sejam alteradas, com a finalidade de torná-las mais adaptadas a competições com outras espécies de bactérias. A maioria dos processos regulados pelo *Quorum Sensing* não são efetivos quando apenas uma bactéria age sozinha, mas, se tornam benéficos quando um grande número de células atua em conjunto (WATERS; BASSLER, 2005).

O *Quorum Sensing* tem a função regular diversos fatores como o de virulência, bioluminescência, esporulação, motilidade, formação do biofilmes e outros processos (HAWVER; JUNG; NG, 2016).

Grupos de pesquisadores vêm estudando a hipótese de que a comunicação química entre bactérias é responsável pelo controle da formação de comunidades bacterianas complexas, conhecidas como biofilme. Em alguns casos não há nenhuma relação entre os dois, porém, diversas espécies demonstraram que biofilmes podem sofrer influência do *Quorum Sensing* (PARSEK; GREENBERG, 2005). Essa associação gera relações simbióticas, proteção e condições de sobrevivência para todos os organismos que estão no biofilme (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

De acordo com Flemming e Wingerder (2010) o biofilme consiste em um conglomerado de diferentes biopolímeros, conhecidos como exopolissacarídeos (EPS) que são responsáveis pela adesão do biofilme à superfície e pela sua forma tridimensional.

Para Post e colaboradores (2004) as bactérias que tem a habilidade de formar biofilme conseguem se comunicar entre as outras e tem mecanismos para difundir nutrientes, água e descartar resíduos. Essa organização é responsável por algumas vantagens, tais como, resistência antimicrobiana, proteção contra agentes agressores externos e a defesa do hospedeiro.

O termo resistência se refere àqueles micro-organismos que não são inibidos pelas concentrações que são habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou para aqueles que apresentam um mecanismo de resistência específico para o agente ao qual não havia uma resposta clínica adequada quando usado em tratamento (MOTA *et al.*, 2005).

A resistência a antimicrobianos permite ao micro-organismo expandir seu nicho ecológico, proporcionando assim a sua proliferação na presença de agentes nocivos. A partir desse ponto, percebe-se que os genes de resistência estão associados a elementos altamente móveis, porque o benefício para o mesmo que é derivado da resistência a antibióticos é transitória, por ação da heterogeneidade temporal e espacial dos antibióticos (OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000).

De acordo com a Associação para o Avanço da Ferida e Cuidados (AAWC; 2008) uma das causas da resistência é a falha do antibiótico em reduzir a carga biológica para um nível no qual as defesas do hospedeiro consigam prevalecer, o que acaba resultando na reconstrução do biofilme e, conseqüentemente, maior resistência.

De acordo com Donlan (2001) os biofilmes estão causando sérios problemas para a saúde pública por causa da suscetibilidade diminuída a agentes microbianos e explica que essa condição pode ser intrínseca, sendo um resultado natural do crescimento no biofilme, ou adquirida, pela transferência de elementos extracromossômicos (plasmídios).

As infecções causadas pelas bactérias resistentes aos antimicrobianos (AMR) são associadas com o excesso de mortalidade, prolongando a estadia dos pacientes no hospital e aumentando os gastos. A atribuição de diferentes fontes e vias que desempenham um papel na transmissão dessas bactérias de importância médica pode ajudar a identificar e priorizar as estratégias de intervenção (HUIJBERS *et al.*, 2015).

O presente trabalho teve como objetivo descrever a relação do *Quorum sensing* com a formação do biofilme e a associação com a resistência bacteriana a antimicrobianos.

2. METODOLOGIA

O presente estudo foi uma revisão bibliográfica no formato narrativo, na qual se trata de publicações amplas, apropriadas para descrever e discutir o desenvolvimento ou o “estado de arte” de um determinado assunto, sob o ponto de vista teórico ou contextual (ROTHER, 2007). Na pesquisa bibliográfica foram utilizadas as bases *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (PubMed) por meio das palavras chave *quorum sensing*, biofilme e resistência antimicrobiana.

Os artigos utilizados tiveram como período de busca os últimos dez anos, sendo o critério de inclusão resumos em inglês e em português. Artigos anteriores a esse período também foram utilizados desde que fossem importantes para a fundamentação do tema.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Mecanismos, vantagens e desvantagens do *Quorum sensing*

Por muito tempo acreditou-se que as bactérias eram células individuais, vivendo em busca de nutrientes, agindo como populações de células independentes e se multiplicando quando o ambiente fosse favorável. Hoje os pesquisadores admitem que as bactérias agem como um sistema colonizador, sendo capazes de produzir metabólitos secundários e a reagir a sinais gerados pelo meio ambiente e por outras bactérias, o que indica a existência de comunicações entre as mesmas (SOLA *et al.*, 2012; KELLER; SURETTE, 2006).

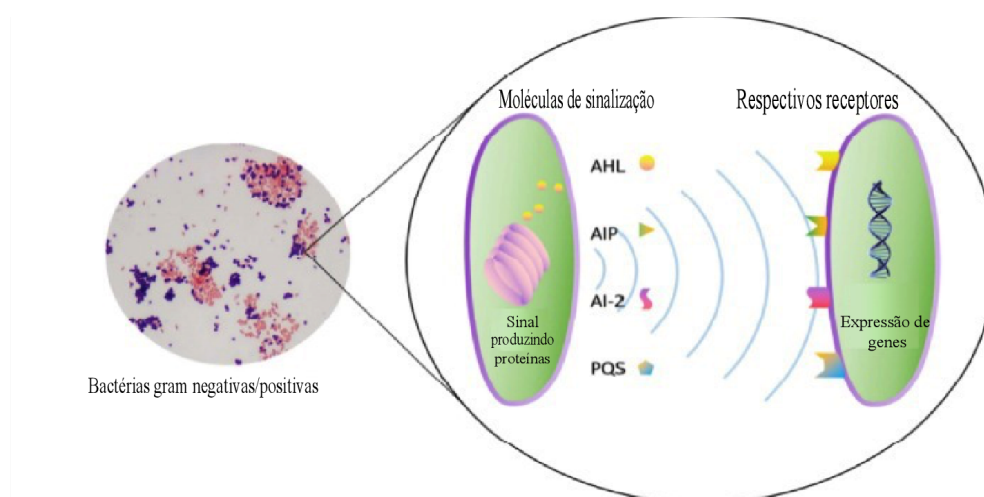
Para Sola e colaboradores (2012) o mecanismo de comunicação celular desempenha um papel central na fisiologia e no funcionamento de organismos vivos, destacando-se a conduta dos grupos de bactérias, através da capacidade de controle de atividades, semelhante às entidades multicelulares. Rumjanek e colaboradores (2004) declaram que esse desempenho coletivo pode ser benéfico para as bactérias, ao analisar o método de migração dessas bactérias para meios mais satisfatórios devido ao melhor oferecimento de nutrientes e, a adesão de novos padrões de crescimento, tais como, esporulação ou o desenvolvimento de biofilmes, analisa-se que estas mudanças acabam por proporcionar melhores circunstâncias ao agente e, conseqüentemente, a proteção contra efeitos deletérios do meio ambiente.

O *Quorum Sensing* (QS) é a expressão usada para descrever a intercomunicação entre as bactérias e o monitoramento populacional. O mecanismo de QS consiste na liberação de sinais químicos, ou autoindutores, através das membranas bacterianas para o meio, permitindo

que o ambiente em que estas se encontram seja monitorado e, a partir de determinada concentração, desencadeiam alterações na expressão dos genes das bactérias, possibilitando a execução de funções biológicas importantes como a indução de fatores de virulência, motilidade, bioluminescência e esporulação, além de tornar as mesmas mais adaptadas às competições com outras espécies de bactérias (PARSEK; GREENBERG, 2005; JAYARAMAN; WOOD, 2008).

O princípio do conjunto de sinalização por meio de moléculas autoindutoras se dá pela ligação de moléculas sinalizadoras (quando se encontram em altas concentrações) à moléculas receptoras que se encontram no exterior ou no interior das bactérias (Figura 1). Essas proteínas receptoras, ou “proteínas R” atuam como reguladoras transcricionais, conseguindo guiar a expressão de determinados genes (SOLA *et al.*, 2012).

Figura 1: Esquema representativo do mecanismo de *Quorum sensing* entre as bactérias por meio da transferência e recebimento dos quatro tipos de moléculas sinalizadoras.



Fonte: Adaptado de Turan *et al.* (2017).

Legenda: A siglas representam: AHL – molécula de QS em bactérias Gram-negativas; AIP – molécula de QS em *Staphylococcus*; AI-2 – molécula de QS interespecíes; PQS – molécula do sistema de QS da *Pseudomonas aeruginosa*.

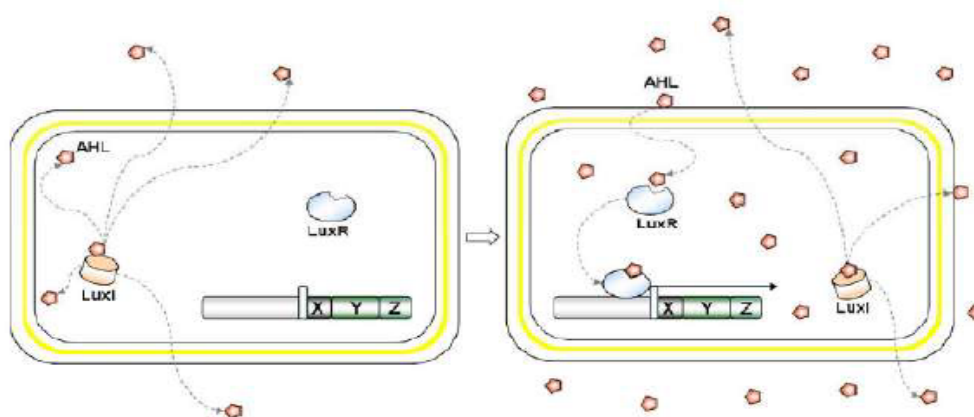
De acordo com Sola e colaboradores (2012) são descritas uma variedade de moléculas indutoras na literatura e podem ser agrupadas em quatro categorias diferentes. O primeiro grupo denominado autoindutor 1 (AI-1), no qual estão localizadas as moléculas que são derivadas de ácidos graxos e possuem a estrutura da N-acil homoserinas lactonas (AHLs), que são utilizadas nas bactérias Gram-negativas na comunicação intraespécies. Já no segundo grupo, encontram-se o autoindutores-2 (AI-2), furanosil borato diéster, utilizado por bactérias tanto Gram-negativas e Gram-positivas (intra e interespecíes). No terceiro grupo AI-3, são moléculas desconhecidas

mas sabe-se da presença delas na bactéria *Escherichia coli*. No último grupo, encontram-se aminoácidos pequenos utilizados por bactérias Gram-positivas na comunicação intraespécies.

As bactérias Gram-negativas utilizam a molécula de N-ácil lactona homosiderina (AHL) como o principal autoindutor, que é sintetizado pela enzima do tipo LuxI que está presente no citoplasma das bactérias. Esse AI tem a capacidade de atravessar a membrana bacteriana por difusão passiva e de acordo com a densidade celular, no qual se acumula tanto dentro quanto fora da célula. A partir do momento em que o AHL atingir a sua concentração estimulatória, este se ligará a proteína LuxR que formará o complexo LuxR-AHL, o qual se acopla a promotores de genes específicos que são regulados pelo QS e, sendo assim, ativa a transcrição (BLASSER, 2002). Alguns exemplos de gene: *pslA* que é o gene para a formação do biofilme na *Pseudomonas aeruginosa*, *lasR* – quorum sensing

Bactérias Gram-negativas utilizam também outro sistema de sinalização. Como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*, na qual faz uso do sistema Rhl/RhR, através do gene *rhIR*, que é responsável pela expressão de diversas enzimas extracelulares, metabólitos secundários e pela formação do biofilme, como é mostrado na figura 2 (DAMACENO; FARIAS, 2016).

Figura 2: Mecanismo de QS (AHLs) de bactérias Gram-negativas como foi descrito anteriormente.



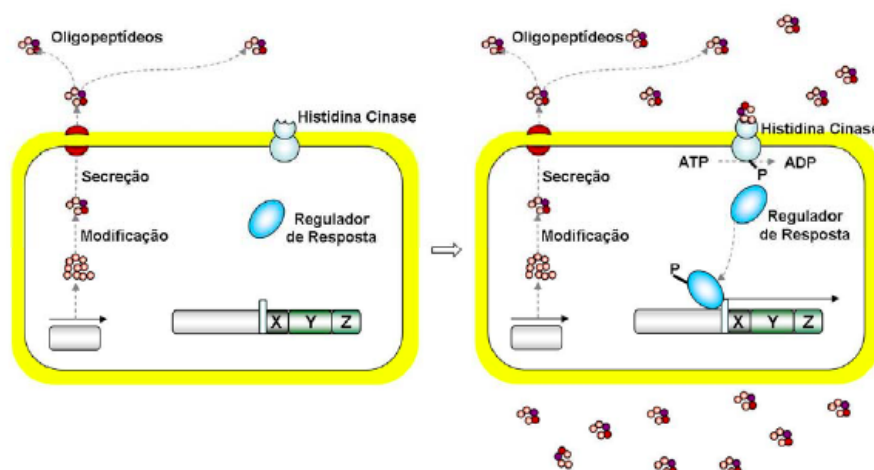
Fonte: Viana (2006).

Legenda: As letra X, Y e Z representam os genes alvo do sistema.

Bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos lineares ou circulares que são sintetizados pela própria célula e após as modificações são transportadas para o meio externo. Quando a concentração dessas moléculas atinge um limite crítico que é dependente da densidade celular, dois componentes passam a detectar uma quinase que está presente na

membrana celular. Esta molécula é capaz de diferenciar o peptídeo e transferir esse sinal para o meio interno, fosforilando a próxima proteína que atua como um regulador de resposta, ligando-se ao DNA e regulando a expressão dos genes alvo (SOLA *et al.*, 2012). Diferente dos receptores citoplasmáticos do autoindutor AHL, os receptores de oligopeptídeos estão ligados a membrana bacteriana e a transdução do sinal ocorre por meio de cascatas de fosforilação de uma proteína regulatória tendo como resposta a ligação ao DNA e regulação da transcrição dos genes alvos (*xyz*), **um exemplo seria o ICA operon que é o gene responsável pela formação do biofilme no *Staphylococcus aureus*** (MILLER; BASSLER, 2001; VIANA, 2006). O modelo para este tipo de comunicação está exemplificado na figura 3.

Figura 3: Mecanismo de QS (oligopeptídeos) de bactérias Gram-positivas.



Fonte: Viana (2006).

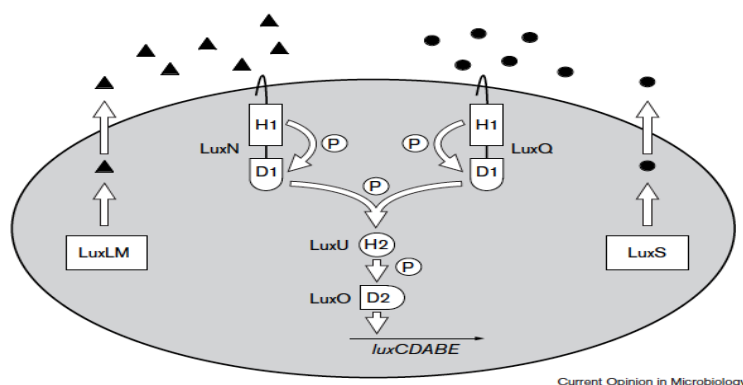
Segundo Federle e Bassler (2003) as bactérias também conseguem ter uma comunicação interespecíes, ou seja, são capazes de estabelecer uma comunicação com espécies diferentes e, para isso, é necessário um mecanismo de reconhecimento de moléculas sinalizadoras diferentes de suas próprias. De acordo com Parsek e Greenberg (2005) foi a partir de estudos com o micro-organismo luminescente, *Vibrio harveyi*, que se percebeu a existência de dois autoindutores para a produção de luz, um sendo para a comunicação entre a mesma espécie e outro para espécies diferentes.

O gene responsável pela comunicação AI-2 foi identificado como *LuxS* e a molécula produzida como autoindutor-2 é um furanosil diéster borato. A síntese do AI-2 ocorre a partir de uma S-adenosilmetionina (SAM) – que atua como precursora comum tanto para N-acil-

homoserina lactonas (AI-1) como para AI-2 – e a enzima *luxS* que participa da quebra de S-ribosil homocisteína, formando dois produtos, uma homocisteína e AI-2 (SOLA *et al.*, 2012).

De acordo com Blasser (1999) a bactéria *Vibrio harveyi* possui um sistema de QS híbrido, formando dois circuitos de detecção, o primeiro sendo o AI-1 (autoindutor HSL) e o segundo sendo o AI-2. O mecanismo desse sistema funciona a partir da síntese de AI-1 e AI-2 que dependem, respectivamente, de *LuxLM* e *LuxS* e, após o aumento da concentração externa dos auto-indutores, ocorre a sinalização por meio de diversas reações de fosforilação/desfosforilação. Os detectores de AI-1, LuxN, e AI-2, LuxQ, contêm um domínio de quinase de sensor com histidina conservada (H1) e outro que regula a resposta em anexo com um aspartato conservado (D1). Os sinais de ambos os sensores são orientados para a proteína integradora LuxU, que é fosforilada em um resíduo de histidina (H2). Após essas etapas, o sinal é transduzido para um resíduo de aspartato conservado (D2) que se encontra na proteína reguladora de resposta LuxO. A LuxO-fosfato é uma enzima regulatória de expressão sob a estrutura de um conjunto de genes (operon) *luxCDABE*. A fosforilação ocorre em um sistema sendo, H1 a D1 a H2 a D2. Os sensores LuxN e LuxQ também possuem atividade da fosfatase que é responsável pela desfosforilação e a inativação de LuxO. Uma proteína de ligação periplasmática, LuxP, é suposta para interagir com LuxQ e reconhecer AI-2, esse mecanismo é mostrado na figura 4.

Figura 4: Esquema de *Quorum* híbrido detectado em *V. harveyi*.



Fonte: Blasser, 1999.

Legenda: Os triângulos representam o AI-1(autoindutor HSL) e os círculos: AI-2; A letra P representa o mecanismo de transdução de sinal.

Pesquisas apontam que o sistema dependente da participação do autoindutor AI-2 já foi identificado em mais de 285 espécies de bactérias, principalmente *Salmonella enterica*,

Escherichia coli e *Vibrio cholerae* e que a regulação desse sistema atua de forma complexa e tendo a modulação sob influência do meio ambiente (VIANA, 2006).

De acordo com Mok, Wingreen e Blasser (2003) sabe-se que a relação desse autoindutor com a sua via biossintética é a mesma em todas as espécies que possuem *luxS* e, por isso, que esse sistema pode ser usado para a comunicação interespecies. Para Miller e Blasser (2001) essas moléculas se encontram no grupo AI-2, podendo ser encontradas tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas, incluindo alguns patógenos.

Em diversos casos o papel do *quorum sensing* tem um papel crítico quando se trata da regulação de patogenicidade bacteriana e o bloqueio desse mecanismo é um dos principais alvos dos medicamentos atuais. Enquanto os pesquisadores procuram drogas sintéticas para bloquear esse mecanismo, parece que os eucariotos suscetíveis a essas infecções conseguiram desenvolver um mecanismo natural que inibe o processo de QS, ou seja, bloqueando os sinais da comunicação, um processo chamado de *Quorum quenching* (QQ), o bloqueio dessa sinalização, além de impedir a formação do biofilme, torna as bactérias mais sensíveis às drogas antimicrobianas e ao próprio sistema imunológico (MILLER; BLASSER, 2001; TURAN, *et al.*, 2017; ANTUNES, 2003; RUTHERFORD, BLASSER, 2012). O *Quorum quenching* pode agir de diversas maneiras, como na redução da atividade da proteína do receptor de AHL, inibição da molécula de QS, degradação de AHL, ou ainda, imitando as moléculas sinalização (KALIA; RAJU; PUROHIT, 2011).

Para alguns pesquisadores o QS evoluiu para que as bactérias conseguissem coordenar o comportamento do grupo e se comportassem como organismos multicelulares. Sugere-se que as moléculas sinalizadoras funcionem como mecanismos de provimento de células individuais com informações relacionadas às propriedades do ambiente ao qual estão inseridos (REDFIELD, 2002).

Para o sistema imune detectar um processo infeccioso é necessário a presença, no organismo, de um número razoável de bactérias e de seus produtos. Além disso, quanto mais cedo esse processo é detectado, mais fácil e rápido será a sua eliminação. Devido ao QS, as bactérias são capazes de controlar a sua expressão gênica e evitar a manifestação precoce de seus fatores de virulência, conseguindo adiar o reconhecimento do processo infeccioso até que um número maior de bactérias esteja presente no organismo e, dessa forma, possa superar o mecanismo de detecção e resposta do sistema imune. Sendo assim, a principal vantagem do sistema de QS pelas bactérias na regulação gênica seria a regulação de cada grupo de genes no momento mais propício para tais micro-organismos.

3.2 Aspectos Gerais da Formação do biofilme

Os biofilmes são formados por comunidades bacterianas que tem como estrutura uma matriz extracelular autoproduzida que compreende uma matriz complexa de polissacarídeos, lipídios, DNA extracelular e proteínas, além de proteger as bactérias de estresses ambientais, exposição à antibióticos e ataque imune (VACCA, 2017).

A formação do biofilme é dependente do sistema de QS, sendo um exemplo relevante de adaptação, no qual as bactérias que o integram, se multiplicam e se tornam parte da comunidade sésil em uma matriz de exopolissacarídeos, evidenciando uma formação cíclica e dinâmica (SOLA *et al.*, 2017).

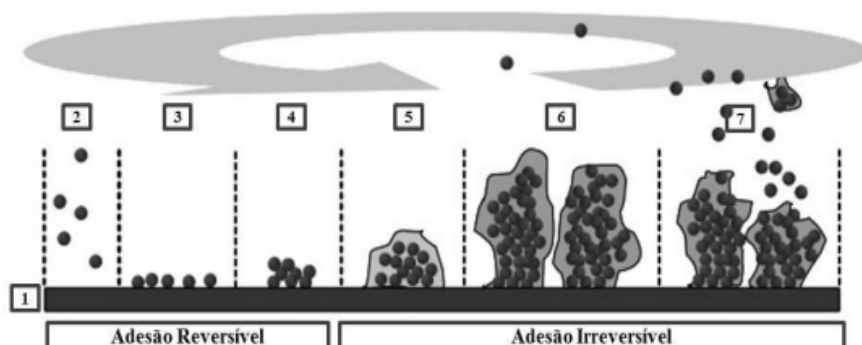
As vantagens da permanência dos micro-organismos em biofilmes são numerosas, principalmente no que se refere à proteção contra agentes agressivos. Além da resistência a sanitizantes e antibióticos os biofilmes também apresentam resistência a luz UV e a desidratação. Com isso, percebe-se que a fisiologia dessa estrutura é diferente (VIANA, 2006).

A formação do biofilme é um processo dinâmico que engloba várias etapas: 1) pré-condicionamento da superfície por macromoléculas presentes no ambiente; 2) transporte de células planctônicas do meio circundante à superfície; 3) adesão inicial em uma superfície biótica ou abiótica; 4) migração de células formando microcolônias, com sinalização molecular - sistema *quorum sensing*; 5) produção da matriz exopolimérica; 6) maturação e desenvolvimento, com internalização de nutrientes, metabolismo dos mesmos e transporte de resíduos, e; 7) liberação de células planctônicas e agregados bacterianos das camadas mais externas, para subsequente dispersão, multiplicação e colonização de novas superfícies, assim, estabelecendo um equilíbrio dinâmico do biofilme (figura 5) (BARROS, 2017).

Para entender o processo de adesão às superfícies (a primeira etapa da formação do biofilme), é necessário examinar as propriedades tanto dos substratos como da superfície celular. As características do substrato podem ter efeitos significativos na taxa de adesão do micro-organismo. Em geral, quanto mais rígido e hidrofóbico, mais rápido será o desenvolvimento do biofilme no substrato. Não obstante, as características da superfície celular também são importantes como, por exemplo, a presença de flagelos, *pilus*, glicocálice ou fimbrias, podem causar impactos na taxa de adesão microbiana. Este impacto é gerado, pois, uma vez introduzida à superfície, as células das bactérias necessitam superar as forças de repulsão comuns a todos os materiais e esses anexos irão permitir que o micro-organismo

permaneça no local até que mecanismos de adesão permanentes sejam produzidos (DONLAN, 2001)

Figura 5: Esquema de formação do biofilme.



Fonte: Barros (2017).

Legenda: 1) pré- condicionamento da superfície; 2) transporte de células planctônicas; 3) adesão inicial em uma superfície; 4) migração de células formando microcolônias – sistema *quorum sensing*; 5) produção da matriz exopolimérica; 6) maturação e desenvolvimento; 7) liberação de células planctônicas.

A maturação da comunidade do biofilme ocorre logo após a sua adesão a superfícies. A arquitetura dos biofilmes maduros pode variar de homogêneos e planos até estruturas complexas com espaços vazios e “torres” de células encapsuladas em uma matriz extracelular. A forma em que o biofilme se encontra afeta a distribuição de gradientes químicos e a potencial tolerância a antimicrobianos (PARSEK; GREENBERG, 2005).

Segundo Parsek e Greenberg (2005) estima-se que células individuais de uma variedade de espécies de bactérias são capazes de sair da formação de biofilme. Este processo é conhecido como dispersão e permite que bactérias colonizem novas superfícies e reiniciem o processo de formação do biofilme. A regulação deste processo pode ser explicada pelo *Quorum Sensing* pois, em situações com muitos indivíduos presentes, os recursos se tornariam limitados e o *QS* poderia servir como mediador da fuga do biofilme.

A sobrevivência do biofilme é resultado de estratégias de adaptação desenvolvidas com o tempo. Uma destas estratégias é a secreção extracelular de substância polimérica (EPS), uma “cola” que protege, une a população de bactérias e permite a absorção de nutrientes e oxigênio. A heterogeneidade de bactérias, presentes em um biofilme, confere também um mecanismo de proteção, pois através dela agentes antimicrobianos são menos efetivos devido à baixa taxa de crescimento (AAWC, 2008).

De acordo com Viana (2006) os biofilmes são importantes em várias atividades humanas. Em estações de água ou de efluentes, os biofilmes são utilizados para remover os organismos patogênicos e reduzir a quantidade de matéria orgânica na água e/ou efluente. Em sistemas aquáticos e no solo, os biofilmes multi-espécies podem ser encontrados na ciclagem de nutrientes como enxofre, nitrogênio e carbono. Alguns bioprocessos também utilizam-se de biofilmes, alguns exemplos são a produção de vinagre, ácido cítrico, aplicações farmacêuticas como a produção de metabólitos secundários e alguns processos biológicos para a extração de metal a partir do minério.

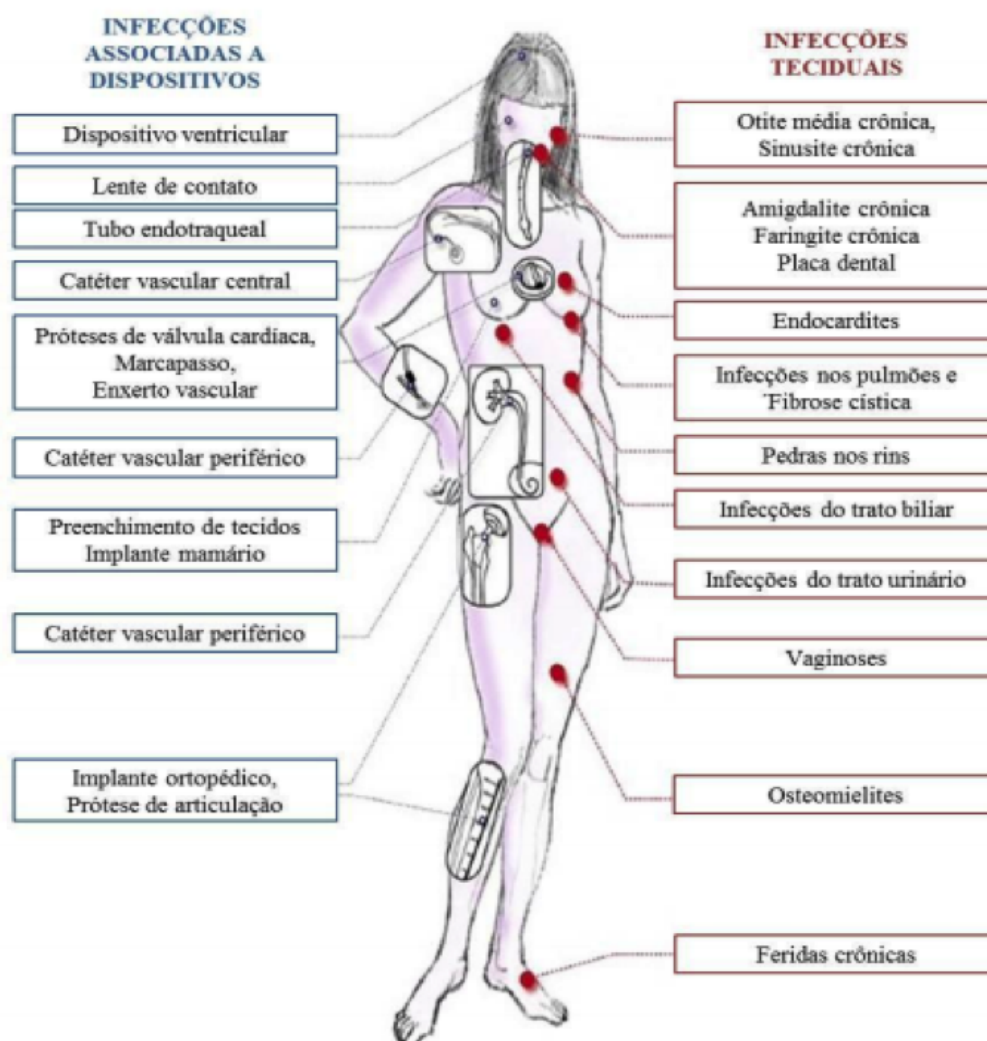
O grande problema é quando o biofilme tem um crescimento não-desejável pois pode causar prejuízos significativos, principalmente na área alimentícia e da saúde. Como já foi relatado, os biofilmes podem ser formados na superfície de cateteres, lentes de contato, marca-passo, válvulas cardíacas e articulações artificiais. É importante ressaltar que os biofilmes exercem um papel fundamental no desenvolvimento de doenças infecciosas pois podem ser formados em qualquer superfície do corpo, persistindo mesmo após o tratamento com altas doses de antimicrobiano (SALDANHA, 2013).

Como infecções causadas por bactérias vêm sendo constantes na vida dos seres humanos por muitos séculos, algumas medidas de prevenção tiveram que ser adotadas, como o caso de desenvolvimento de vacinas e antibióticos visando o controle das infecções. No entanto, da mesma forma que a ciência evolui, os micro-organismos encontram novos meios de se proteger das ameaças destinadas a eles e uma das principais estratégias é o uso do biofilme (DEL POZO, 2017). De acordo com o *National Institute of Health* (NIH), cerca de 80% das infecções em humanos, como endocardite, osteomielite, sinusite, infecções do trato urinário, periodontite e várias infecções hospitalares, especialmente as relacionadas a biomateriais, são causadas por micro-organismos capazes de formar biofilme (AAWC, 2008). Essas infecções geralmente se apresentam da forma crônica, nas quais a infecção continuará presente apesar do uso adequado de terapias e dos mecanismos de imunidade inata e adaptativa do hospedeiro. (HØIBY *et al.*, 2014).

De acordo com Høiby e colaboradores (2014) as infecções por biofilme podem ser classificadas por dois grandes grupos: 1) aquelas que são associadas a biomateriais e; 2) as que não são associadas a biomateriais mas são encontradas em tecidos e/ou mucosas. O primeiro grupo compreende as infecções relacionadas a colonização do biofilme em biomateriais implantados dentro do corpo do paciente ou que faça conexão entre o meio externo e interno, neste grupo estão presentes as infecções associadas com próteses ortopédicas, tubos endotraqueais, cateteres intravenosos e urinários, lentes de contato e

próteses de mama. Já o segundo engloba os pacientes com infecções pulmonares crônicas decorrentes de fibrose cística e pacientes com feridas crônicas. Nesses casos o biofilme é encontrado no tecido e no escarro de pacientes com fibrose cística.

Figura 6: Principais infecções relacionadas com o biofilme.



Fonte: Høiby *et al.* (2014).

De acordo com Barros (2017) os principais micro-organismos responsáveis pela formação de biofilmes em materiais biomédicos são bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans* e *Enterococcus faecalis*, e Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis* (tabela 1). Acrescenta ao falar que a interação entre várias espécies no biofilme, uma comunidade complexa, pode resultar em

comportamentos sinérgicos de cooperação e maior resistência às defesas do hospedeiro e a agentes microbianos.

Tabela 1: Principais bactérias formadoras de biofilme em implantes biomédicos.

IMPLANTE MÉDICO	BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILME
Prótese Artificial Vocal	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Rothia dentocariosa</i> <i>Streptococcus sobrinus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Stomatococcus mucilaginous</i>
Prótese artificial de quadril	<i>Staphylococcus Coagulase-negativo</i> <i>Streptococcus β hemolítico</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Bacteroides sp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Prótese articular	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>
Próteses de válvulas cardíacas	<i>Streptococcus viridans</i> <i>Staphylococcus Coagulase-negativo</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>S. aureus</i>
Marca-passos cardíacos	<i>S. aureus</i>
Dispositivo para desvio do líquido cefalorraquidiano	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Enterococcus sp.</i>
Tubo endotraqueal	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>P. aeruginosa</i>
Cateter urinário	<i>S. epidermidis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>E. faecalis</i> <i>P. mirabilis</i>
Cateter venoso central	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>
Lente de contato	<i>P. aeruginosa</i> Cocos gram positivos

Implante dental	Cocos Gram-positivos acidogênicos Bactérias orais anaeróbicas Gram-negativas
Próteses implantadas para a disfunção erétil	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>
Implantes ortopédicos	<i>Streptococcus hemolítico</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Bacteroides sp.</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
Implantes de mama	<i>S. aureus</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>S. epidermidis</i>
Dispositivos contraceptivos intrauterinos	<i>Micrococcus sp</i> <i>Enterococcus sp</i> <i>Streptococcus</i> Grupo B

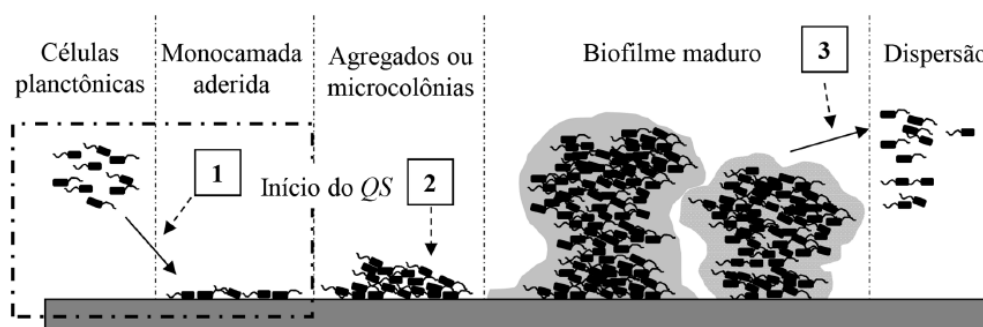
Fonte: Barros (2017).

Como já foi falado, os biofilmes têm gerado um grande problema para a saúde pública pois é muito comum em infecções persistentes, e com isso pode-se dividir as estratégias de combate em dois segmentos: a inibição do biofilme e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados. Quando se trata da inibição do biofilme pode-se realizar dois procedimentos: pela inibição do crescimento bacteriano, através do uso de bactericidas/bacteriostáticos, ou pelo bloqueio da adesão bacteriana que consequentemente afeta a formação do biofilme por uma via que não envolve a morte de bactérias, como mostra na figura 7 os passos 1 e 2, respectivamente (MIQUEL *et al.*, 2016; TRENTIN, 2013).

Essas novas metodologias terapêuticas podem ser consideradas alternativas e/ou complementares aos antibióticos, tendo estes mecanismos ações diferentes. A inibição da formação do biofilme pode ser realizada pelo bloqueio da adesão bacteriana a uma superfície ou pela descontinuação da comunicação bacteriana (QS). Para bloquear a adesão celular bacteriana à superfície desenvolveu-se novos mecanismos como, por exemplo, superfícies que evitam as interações físico-químicas que interferem na adesão primária ao substrato, recobrando as superfícies com diversos compostos que contenham essas moléculas inibidoras. Após a adesão primária, o impedimento da formação do biofilme se dá pela interferência na comunicação bacteriana, através do processo denominado *Quorum Quenching* (QQ), já que as moléculas inibidoras competem com o receptor das moléculas de QS, degradando as moléculas de sinalização. Outra maneira é a erradicação de biofilmes que já estão formados que ocorre por uso de antimicrobianos ou a substituição de dispositivos biomédicos, porém

como o biofilme não é um processo imutável os micro-organismos conseguem desfazê-lo quando se encontram em condições desfavoráveis como, mudança de pH ou privação nutricional. O conhecimento de moléculas que estimulam o processo natural de dispersão do biofilme ajuda na busca de compostos para a erradicação de biofilmes (TRENTIN, 2013).

Figura 7: Principais alvos para o combate aos biofilmes microbianos.



Fonte: Trentin (2013).

Legenda: Etapa 1: a inibição da formação de biofilmes pelo bloqueio da adesão bacteriana à superfície. Etapa 2: o rompimento da comunicação celular bacteriana (QS). Etapa 3: erradicação ou tratamento de biofilmes já formados.

Ramage *et al* (2012) relatam que fungos também podem causar infecções graves com a formação do biofilme, sendo que a *Candida albicans* é o agente mais frequentemente associado a essas infecções. O fungo age como um agente oportunista principalmente em pacientes imunodeprimidos. Os autores expõem também que as infecções fúngicas representam uma carga considerável de infecção na população hospitalar e descrevem os fatores mais importantes para essas infecções invasivas como: o uso de antibióticos de amplo espectro, nutrição geral, cateteres permanentes, a presença de imunossupressão e a ruptura de barreiras devido à cirurgias. Jabra-Rizk, Falker e Meiller (2004) falam que os fungos associados ao biofilme são consequências refratárias à terapia convencional devido à resistência a antimicrobianos.

O setor de biotecnologia está começando a enfrentar o problema da formação dos biofilmes desenvolvendo agentes antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes, pesquisadores estão estudando qual procedimento será melhor para tentar impedir a formação desses biofilmes, alguns falam sobre o antimicrobiano inibir a formação do biofilme, outros visam criar drogas para tratar os biofilmes existentes e a outra opção é tentar romper as ligações poliméricas na estrutura do biofilme (SCHACHTER, 2003).

3.3 Mecanismos de Resistência

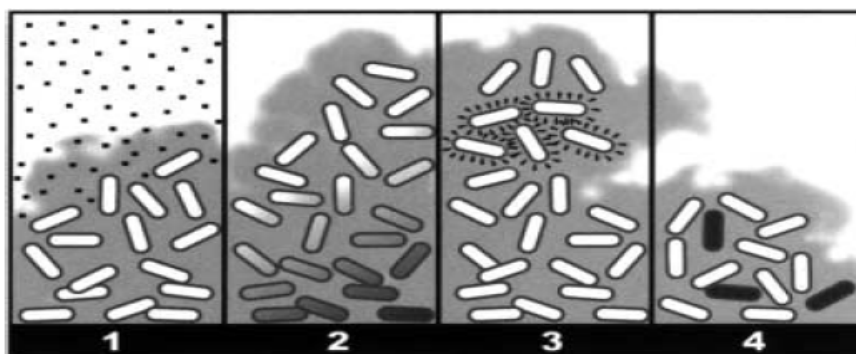
Segundo Davies (2003) as bactérias que estão presentes nessa estrutura possuem de 10 a 1000 vezes mais resistência do que quando encontradas em sua forma planctônica. De acordo com Hall e Mah (2017) a resistência é medida em micro-organismos planctônicos pela concentração mínima inibitória (MIC) que é a menor concentração em que o agente antimicrobiano consegue inibir o crescimento do micro-organismo.

Davies (2003) cita vários fatores que são sugeridos para explicar a resistência das bactérias que estão dentro do biofilme aos antimicrobianos, como: 1) o crescimento lento das células das camadas mais internas do biofilme, que são chamadas de células dormentes/persistentes (*persisters*), que se encontram com uma taxa metabólica reduzida e pouca disponibilidade de oxigênio; 2) baixa penetração dos agentes antimicrobianos, em que a matriz exopolimérica reduz de maneira química ou física a penetração do agente; 3) ocorre a transferência horizontal de genes de resistência ligados à alteração dos alvos e a expressão de bombas de efluxo e enzimas degradadoras ou neutralizadoras.

Para Høiby e colaboradores (2014) e Davies (2003) esses fatores indicam que as infecções por biofilmes são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, mesmo que este esteja com adequadas reações imunes, celular e humoral. A cronicidade das infecções causadas por biofilme são caracterizadas pelo dano tecidual e inflamação persistente, isso ocorre por causa da resistência à resposta imune do hospedeiro e aos agentes microbianos.

Stewart (2002) acrescenta que os mecanismos de proteção que foram citados mesmo já sendo conhecidos não são a raiz do problema da baixa suscetibilidade antimicrobiana nos biofilmes. O autor explica que a rápida reversão de resistência à dispersão de um biofilme sugere um mecanismo de resistência adaptativa e não de alteração genética, indicando quatro hipóteses para a baixa suscetibilidade de antimicrobianos nos biofilmes (figura 8): 1) é a baixa ou incompleta penetração desses agentes (antimicrobianos) no biofilme; 2) um gradiente de concentração de um substrato metabólico ou produto que é conduzido para as zonas de células com metabolismo baixo; o número; 3) é uma resposta adaptativa ao estresse causado a essas células; o número; 4) é quando uma pequena fração das células que se diferenciam para um estado altamente protegido.

Figura 8: Quatro hipóteses relacionadas à suscetibilidade de antimicrobianos nos biofilmes.



Fonte: Stewart (2002).

Legenda: Em 1, os quadrados indicam os antibióticos; 2, células sombreadas representam a camada celular com baixo metabolismo; 3, células marcadas são as que mostraram estresse adaptativo; 4, células escuras são as células que sofreram a diferenciação.

Essas hipóteses que foram descritas anteriormente não tem uma base genética e molecular bem estabelecida, com isso Stewart (2002) especula sobre os tipos de genes ou moléculas que talvez estejam envolvidas nesses mecanismos. Na primeira hipótese o autor fala sobre uma interação reação-difusão, onde enzimas conseguem inativar ou sequestrar os antimicrobianos. Na segunda explica um pouco sobre o gradiente químico que é encontrado na formação do biofilme, onde se encontram células com crescimento lento e estacionárias. Relaciona a suscetibilidade dos antimicrobianos com células de crescimento lento, sendo assim, os genes, aqueles que são necessários para a formação de estruturas multicelulares, que tem seus produtos envolvidos na transformação das vias metabólicas bacterianas, ou nas próprias vias, são essenciais para a defesa do biofilme.

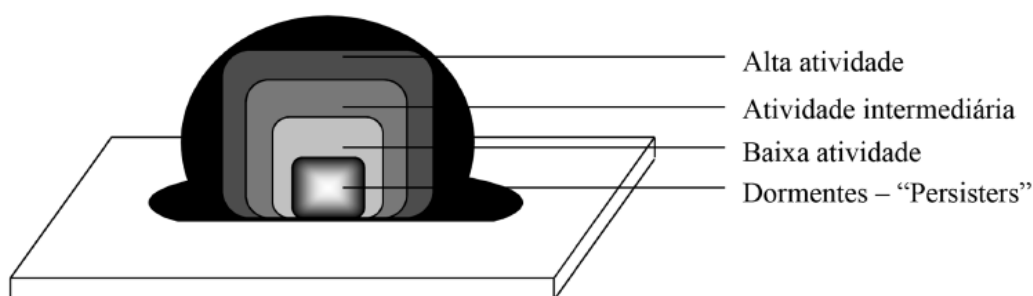
Na terceira hipótese, descreve que as bactérias possuem uma série de mecanismos de resposta ao estresse que lhes permitem lidar com as alterações ambientais. Essas respostas podem ser induzidas através de mudanças abruptas no ambiente, tanto em bactérias que estão no biofilme como em bactérias que estão suspensas, a diferença é que as células de um biofilme tem uma oportunidade maior de expressar essas características (STEWART, 2002).

Stewart e Franklin (2008) explicam que os biofilmes são compostos por populações heterogêneas, com variada taxa de metabolismo e suscetibilidade aos antimicrobianos (figura 9). A tolerância a estes pode resultar da inibição da morte celular natural em uma população de células bacterianas conhecidas como células dormentes, essa população apresenta uma taxa metabólica reduzida e comumente se encontra na base da estrutura do biofilme, onde há limitada oferta de oxigênio. O baixo metabolismo que essas células têm garantem a sua resistência ao tratamento com antimicrobianos, visto que estes geralmente agem na fase de

crescimento bacteriano, como na síntese proteica, de ácidos nucleicos e da parede celular. Com isso, o tratamento pode conduzir à erradicação da maior parte das células que se encontram nessa estrutura porém a fração de células persistentes não é atingida e, com isso, atuam como um núcleo para a reinfecção (**último mecanismo descrito por Stewart**).

Outro ponto importante que Trentin (2013) cita é a transferência de genes de resistência, o qual ocorre pela transferência horizontal de genes, o que é facilitada pela vida em comunidade, por plasmídeos os quais conseguem codificar resistência para múltiplos agentes microbianos. Bryers (2008) da continuidade e fala a respeito da falha do sistema imune humano ao reconhecer os biofilmes devido à presença do EPS. Com isso, as células que estão no interior do biofilme estão protegidas contra a ação de anticorpos, radicais livres e outros mecanismos que o corpo humano ativa em uma infecção.

Figura 9: Heterogeneidade populacional com a variada taxa de atividade metabólica em um biofilme.



Fonte: Trentin (2013).

Legenda: No interior populações de células em estado de latência metabólica, no topo da estrutura a população apresenta uma elevada taxa metabólica.

Saldanha (2013) mostra outros fatores que influenciam na resistência a antimicrobianos, como a produção de enzimas que inativam os antimicrobianos, como as β -lactamases. O acúmulo dessas moléculas produz um gradiente de concentração que protege as células bacterianas. Castanheira (2013) relata sobre a resistência intrínseca ou natural desses micro-organismos, que é uma condição transmitida verticalmente apenas. Explica que o antibiótico não consegue penetrar na membrana celular devido à dimensão da molécula ou por causa dos genes que codificam os vários mecanismos de resistência que estão presentes no código genético da estirpe selvagem.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bactérias resistentes a antimicrobianos e com capacidade de formar o biofilme vem sendo cada vez mais estudadas pois representam um grande problema a saúde pública por causa da dificuldade de tratar as infecções que geram e, conseqüentemente, aumentam a taxa de mortalidade. Contudo, existem vários motivos para o entendimento dessa relação da formação do biofilme e a resistência a antimicrobianos, que pode ser atribuída a alguns fatores como: a transferência horizontal de genes, o uso indiscriminado de antibióticos e a permanência de células dormentes.

5. REFERÊNCIAS

AAWC (Association for the Advancement of Wound Care). **Advancing your practice: Understanding Wound Infection and the Role of Biofilms**. Malvern: AAWC. 2008.

ANTUNES, L. A Linguagem das Bactérias. **Ciência hoje**, Iowa v. 33, n. 193, p. 16-20, Maio 2003.

BARROS, M. **Venenos como fonte de moléculas ativas contra biofilmes bacterianos patogênicos**. 2017. 128f. Dissertação (Mestrado/Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017.

BLASSER, B. How Bacteria Talk to Each Other: regulation of Gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 2, p. 582-587, Dez 1999.

BRYERS, J. Medical Biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.1, p. 1-31, Maio, 2008.

CASTANHEIRA, B. **Mecanismos de Resistência a Antibióticos**. 2013. 45f. Dissertação (Mestrado) do Programa Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Campo Grande – Lisboa, 2013

DAMACENO, B; FARIAS, R. Relação existente entre biofilmes bacterianos, quórum sensing, infecções e resistência a antibióticos: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, Brasília, v. 3, n. 2, p. 46-51, Abr. 2016

DEL POZO, L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, Londres, v. 16, n. 1, p. 51-65, dez. 2017.

DELISA, M. *et al.* DNA Microarray-Based Identification of Genes Controlled by Autoinducer 2-Stimulated Quorum Sensing in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, p. 5239-5247, Set. 2001.

DAVIES, D. Understanding Biofilm Resistance to Antibacterial Agents. **Nature Reviews, Drug Discovery**, London, v. 2, p. 144-122, Fev. 2003.

DICKEY, S. CHEUNG, G. OTTO, M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v.16, p. 457-471, Jul. 2017

DONLAN, R. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.33, p. 1387-1392, Out. 2001.

FEDERLE, M; BASSLER, B. Interspecies Communication in Bacteria. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 112, n. 9, p. 1291-1299, Nov. 2003.

FLEMMING, HC. WINGENDER, J. The Biofilm Matrix. **Nature Reviews. Microbiology**. London, v. 8, p. 623-633, Ago. 2010.

HALL, C; MAH, TF. Molecular Mechanisms of Biofilms-Based Antibiotic Resistance and Tolerance in Pathogenic Bacteria. **Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 1-26, Maio. 2017.

HAWVER, A; JUNG, S; NG, WL. Specificity and complexity in Bacterial quorum-sensing systems. **Federation of European Microbiological Societies**, Boston, v. 40, p. 738-752, Jun. 2016.

HØIBY, N. *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 21, n. 1, p. 1-25, 2014.

HUIJBERS, P. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 49, p. 11993-12004, Out. 2015.

JABRA-RIZK, M; FALKLER, W; MEILLER, T. Fungal Biofilms and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, Baltimore, v.1, p.14-19, Jan. 2004.

JAYARAMAN, A; WOOD, T. Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v.10, p. 145-167, Ago. 2008.

KALIA, V; RAJU, S; PUROHIT H. Genomic Analysis Reveals Versatile Organisms for Quorum Quenching Enzymes: Acyl-Homoserine Lactone-Acylase and –Lactonase. **The Open Microbiology Journal**. India, v.5, p. 1-13. Fev 2011.

KASNOWSKI, M. *et al.* Formação de Biofilme na Indústria de Alimentos e Métodos de Validação de Superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Niterói, v.15, s.p., Jul. 2010.

KELLER, L; SURETTE, M.G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 4, n.4, p. 249-258, abr. 2006.

MILLER, B; BASSLER, L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 165-199, out. 2001.

MIQUEL, S, *et al.* Anti-biofilm Activity as Health Issue. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 7, p. 1-14, Abr, 2016.

MOK, K; WINGREEN, N; BLASSER, B. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. **European Molecular Biology Organization**, England, v.22, p. 870-881, Fev. 2003.

MOTA, R. *et al.* Utilização Indiscriminada de Antimicrobianos e Sua Contribuição a Multirresistência Bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, p. 465-470, Jun. 2005.

OCHMAN, H; LAWRENCE, J; GROISMAN, E. Lateral Gene Transfer and the Nature Of Bacterial Innovation. **Nature**, London, v.405, p. 299-304, Maio. 2000.

PARSEK, M; GREENBERG, P. Sociomicrobiology: The Connections Between Quorum Sensing And Biofilms. **Department of Microbiology**, England, v. 13, p. 21-33, Jan 2005.

POST, J. *et al.* The Role of biofilm in otolaryngologic infections. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**, Philadelphia, v. 12, p. 185-190, Fev 2004.

RAMAGE, G. *et al.* Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, Reino Unido, v. 2012, p. 1-14, Jul. 2012.

REDFIELD, R. Is Quorum Sensing a Dide Effect of Diffusion Sensing? **Trends in Microbiology**. England, v. 10, p. 365-370, Ago 2002.

ROTHER, E. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**. São Paulo, v. 20, p. v-vi, Abr/Jun. 2007.

RUTHERFORD, S; BLASSER, B. Bacterial Quorum Sensing: Its Role In Virulence and Possibilities for Its Controls. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. Cold Spring Harbor, v. 2, p 1-25, Abr 2012.

SALDANHA, J. **Emprego de Nanopartículas em Estratégias de Prevenção e Tratamento de Infecções Relacionadas à Formação de Biofilmes Bacterianos**. 2013. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2013

SCHACHTER, B. Slim Business – the biotechnology of biofilms. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 21, p. 361- 365, Abr. 2003

SOLA, M. C. *et al.* Mecanismos de Quorum Sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. **Enciclopédica Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1419-144, 2012.

STEWART, P. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, Alemanha, v. 292, p. 107-113, Jul. 2002.

STEWART, P; FRANKLIN M. Physiological Heterogeneity in Biofilms. **Nature Reviews. Microbiology**, Londres, v. 6, p. 199-210, Mar 2008.

TRENTIN, D. **Biofilmes Bacterianos Patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégia de combate**. 2013. 24f. Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2013.

TURAN, N; *et al.* *Quorum sensing*: little talks for an effective bacterial coordination. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 91, p. 1-11, Jun 2017.

VACCA, I. Biofilms: Building Up The Matrix. **Nature Reviews Microbiology**. Londres, v. III, p. , Jul. 2017.

VIANA, E. **Moléculas Sinalizadoras de *Quorum sensing* em Biofilmes Formados por Bactérias Psicrotróficas Isoladas de Leite**. 2006. 176f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2006.

WATERS, C; BASSLER, B. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. Palo Alto, v. 21, p. 319-346, Nov 2005.